

李东东,李晓明,吴雪莲,等. 骨痹散通过调节 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路减轻兔膝关节关节炎损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 100–107.

Li DD, Li XM, Wu XL, et al. Gubi powder alleviates knee osteoarthritis injury by regulating transforming growth factor- $\beta$ /Smad signaling pathway in rabbits [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 100–107.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.013

# 骨痹散通过调节 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路减轻兔膝关节关节炎损伤

李东东<sup>1</sup>,李晓明<sup>2</sup>,吴雪莲<sup>2</sup>,易 露<sup>1</sup>,陈光友<sup>1\*</sup>

(1.西南医科大学附属中医医院,四川 泸州 646000;2.西南医科大学康复医学系,四川 泸州 646000)

**【摘要】 目的** 探讨骨痹散对骨关节炎的治疗效果及其机制。**方法** 将新西兰大白兔分为空白组、模型组、阳性组(双氯芬酸钾凝胶)与骨痹散组,每组 6 只,使用改良 Hulth 法构建兔膝关节关节炎模型,造模 8 周后给药 4 周。对软骨组织进行甲苯胺蓝染色后测量软骨厚度,番红-O 染色后进行 Mankin 评分;使用 Tunel 荧光染色法检测软骨组织中软骨细胞的凋亡情况;使用免疫组织化学法检测软骨组织中 Col II 与 Col X 蛋白的表达水平;使用 Western blot 法检测软骨组织中 Bax、cleaved-caspase-3、p-ERK、p-p38、p-Smad2、p-Smad3、TGF- $\beta$ 1 的蛋白表达水平。**结果** 与空白组相比,模型组软骨组织厚度减少,Mankin 评分升高,软骨细胞凋亡率升高,Col II、p-Smad2、p-Smad3、TGF- $\beta$ 1 蛋白表达水平减低,Col X、Bax、cleaved-caspase-3、p-ERK、p-p38 蛋白表达升高。与模型组相比,阳性组与骨痹散组软骨组织厚度增加,Mankin 评分降低,软骨细胞凋亡率降低,Col II、p-Smad2、p-Smad3、TGF- $\beta$ 1 蛋白表达水平升高,Col X、Bax、cleaved-caspase-3、p-ERK、p-p38 蛋白表达降低。**结论** 骨痹散对骨关节炎具有良好的治疗效果,能通过减少软骨细胞凋亡,稳定软骨组织结构,促进软骨组织损伤后再生与修复,其机制可能与抑制 ERK/P38 通路、激活 TGF- $\beta$ /Smad 通路有关。

**【关键词】** 骨关节炎;骨痹散;软骨组织;ERK/P38 通路;TGF- $\beta$ /Smad 通路

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0100-08

## Gubi powder alleviates knee osteoarthritis injury by regulating transforming growth factor- $\beta$ /Smad signaling pathway in rabbits

LI Dongdong<sup>1</sup>, LI Xiaoming<sup>2</sup>, WU Xuelian<sup>2</sup>, YI Lu<sup>1</sup>, CHEN Guangyou<sup>1\*</sup>

(1. the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.  
2. Department of Rehabilitation Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000)

**【Abstract】 Objective** To investigate the therapeutic effect and mechanism of Gubi powder on osteoarthritis.  
**Methods** New Zealand white rabbits were divided into a blank group, model group, positive group (diclofenac potassium gel), and Gubi powder group ( $n = 6$  rabbits per group). A rabbit knee osteoarthritis model was constructed using the modified Hulth method, and the treatments were administered for 4 weeks after 8 weeks of modeling. Cartilage thickness was measured by toluidine blue staining and the Mankin score was derived after Mucovite O staining of cartilage tissue. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling fluorescence staining was used to detect the apoptosis of chondrocytes in cartilage tissue. Collagen (Col) II and collagen X protein expression levels in cartilage tissue were

[基金项目] 大学生创业国家级课题(202110632059);西南医科大学附属中医医院课题(2018XYLH-019)。

[作者简介] 李东东(1983—),男,硕士,主治医师,研究方向:骨关节与脊柱疾病。E-mail:lidd831116@163.com

[通信作者] 陈光友(1974—),男,博士,副教授,副主任中医师,研究方向:骨关节与脊柱疾病。E-mail:doctorcgy@swmu.edu.cn

detected by immunohistochemistry and expression levels of Bax, cleaved-caspase-3, phospho (p) extracellular signal-regulated kinase (ERK), p-p38, p-Smad2, p-Smad3, and transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 in cartilage tissues were detected by Western blot. **Results** Cartilage thickness was decreased, the Mankin score and chondrocyte apoptosis rate were increased, Col II, p-Smad2, p-Smad3, and TGF- $\beta$ 1 protein expression levels were decreased, and Col X, Bax, cleaved-caspase-3, p-ERK, and p-p38 levels were increased in the model group compared with the control group. Cartilage thickness was increased, the Mankin score and chondrocyte apoptosis rate were decreased, Col II, p-Smad2, p-Smad3, and TGF- $\beta$ 1 expression levels were increased, and Col X, Bax, cleaved-caspase-3, p-ERK, and p-p38 protein expression were decreased in the positive and Gubi powder groups compared with the model group. **Conclusions** Gubi powder showed good therapeutic efficacy against osteoarthritis in rabbits, by reducing chondrocyte apoptosis, stabilizing cartilage tissue structure, and promoting the regeneration and repair of cartilage tissue after injury. Its mechanism may be related to inhibition of the ERK/P38 pathway and activation of the TGF- $\beta$ /Smad pathway.

**[ Keywords ]** osteoarthritis; Gubi powder; cartilage tissue; ERK/P38 signaling pathway; TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种骨科常见疾病,主要临床表现为关节疼痛、肿胀和活动受限<sup>[1]</sup>。流行病学研究表明,随着老龄化人口和肥胖患病率增加,OA 在全球范围内的患病率均有所增加,约有 31.4 亿患者,老年人占比超过 10%<sup>[2]</sup>。迄今为止,OA 的发病机制尚未完全了解,软骨退行性病变被认为是 OA 发病的关键,如果在关节软骨出现严重损伤后不及时采取措施进行治疗,最终就会发展成为 OA<sup>[3]</sup>。骨关节炎病理特征一般为软骨下出现透明软骨、钙化软骨、软骨下骨等退行性病变<sup>[4]</sup>,随着病情发展使关节软骨失去支撑或缓冲作用后,关节会迅速变脆,然后释放炎症因子,加重关节损伤<sup>[5]</sup>。转化生长因子 (transforming growth factor, TGF- $\beta$ ) 对关节软骨的形成与分化十分关键,因为关节软骨由被细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 包裹的软骨细胞组成, TGF- $\beta$ 1 通过调控下游 Smad 通路促进 ECM 形成,加快软骨再生从而修复关节软骨损伤<sup>[6-7]</sup>。因此,软骨损伤的修复对降低 OA 发生率与缓解 OA 患者症状具有重要意义。目前骨关节炎治疗仅侧重于缓解症状,对软骨组织再生或重建的帮助微乎其微。

中医在治疗 OA 方面存在着一套独特的理论,如针刺穴位、针刀疗法、中药内服、推拿等,均对缓解病情有积极作用<sup>[8-9]</sup>。现代药理学研究显示,中药方剂对膝骨关节组织的炎症有良好的抑制作用,对 TGF- $\beta$ /Smad 通路也有一定的调节作用,这有可能成为治疗骨关节炎的突破口<sup>[10]</sup>。本院的骨痹散,以制川乌、制草乌等 16 味中药组成,用蜂蜜调制后外用,在临床上对骨关节炎有一定的治疗作用,前期动物实验也发现骨痹散对软骨组织有促进修复

的效果,但其中所涉及的机制尚不明确,因此本实验将基于 TGF- $\beta$ /Smad 通路进一步探讨骨痹散治疗骨关节炎的潜力。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

本实验采用实验动物为新西兰大白兔,清洁级,24 只,体重 3~4 kg,4~5 月龄,雄性,购自成都达硕实验动物有限公司 [SCXK (川) 2019-0031]。本项目由西南医科大学实验动物伦理委员会审批通过 (swmu201901426)。所有动物饲养于西南医科大学实验动物中心 [SYXK (川) 2018-0065],室内温度保持在 20~24℃,所有动物在饲养与实验过程中均遵循 3R 原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

骨痹散由西南医科大学附属中医医院提供 (制川乌 18 g、制草乌 18 g、川芎 12 g、乳香 12 g、没药 12 g、海桐皮 24 g、透骨草 24 g、白鲜皮 18 g、酒军 18 g、秦艽 18 g、威灵仙 18 g、桑枝 18 g、甘草 12 g、禹白附 18 g、王不留行 24 g、莱菔子 24 g、蜂蜜调配);双氯芬酸钾凝胶,国药准字 H20020385,购自太极集团·四川天诚制药有限公司;Tunel 荧光染色试剂盒 (瑞士罗氏公司,货号:11684795910);胶原蛋白 II (Col II) (ab34712)、胶原蛋白 X (Col X) (ab182563)、BCL2 关联 X 蛋白 (Bcl2 Associated X Protein, Bax) (ab32503)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (cleaved-caspase-3) (ab214430)、磷酸化细胞外信号调节激酶 (p-ERK) (ab201015)、磷酸化 p38 蛋白 (p-p38) (ab4822)、磷酸化信号转导分子 2 (p-Smad2) (ab188334)、磷酸化信号转导分子 3 (p-Smad3)

(ab52903)、TGF-β1(ab215715)和β-actin(ab8227)均购自艾博抗(上海)贸易有限公司。

CX23 荧光显微镜(日本 Olympus 公司); ChemiDoc 多功能凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司); Mini-PROTEAN® Tetra 蛋白质电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 膝骨关节炎动物模型的构建<sup>[11]</sup>

将 24 只动物分为空白组、模型组、阳性组与骨痹散组,每组 6 只,采用改良 Hulth 法构建膝骨关节炎兔子模型,先在耳缘静脉注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)进行麻醉,在动物右膝骨关节髌内侧做 3 cm 纵向切口,逐层切开并暴露关节,髌骨往外脱位,完整切除内侧半月板、前交叉韧带(ACL),内侧副韧带(MCL)。空白组只进行关节暴露,不进行半月板与韧带切除。术后肌肉注射青霉素 160 万 IU/(kg

·d),连续注射 8 d。术后第 4 天即强迫动物进行奔跑(0.5 h/d),持续 8 周。

1.3.2 给药

模型构建完毕后开始给药,空白组与模型组膝关节处涂抹生理盐水,阳性组涂抹双氯芬酸钾凝胶,骨痹散组涂抹骨痹散,均匀覆盖膝关节表面,每天 2 次,持续 4 周。

1.3.3 动物膝骨关节病理学观察

给药完成后处死动物,收集膝骨关节软骨组织制作病理切片,甲苯胺蓝染色与番红-O 染色,测量软骨层厚度与 Mankin 评分,四项指标合计为最终得分,评分标准见表 1。

1.3.4 免疫荧光染色

各组动物软骨组织按标准流程制备病理切片,切片脱蜡后进行荧光 Tunel 染色,在荧光显微镜下观察凋亡细胞数量,每张切片采集 3 个区域,每个区

表 1 骨关节炎病理学评分表

| Table 1 Pathological evaluation table of osteoarthritis |          |                                                                            |
|---------------------------------------------------------|----------|----------------------------------------------------------------------------|
| 项目 Items                                                | 评分 Score | 描述 Description                                                             |
| 骨组织<br>Bone tissue                                      | 0        | 正常组织<br>Normal tissue                                                      |
|                                                         | 2        | 组织表面不规则及血管翳<br>Tissue surface irregularity and pannus                      |
|                                                         | 4        | 组织裂隙深达软骨辐射层<br>Tissue fissures deep into the cartilaginous radiation layer |
|                                                         | 6        | 组织结构完全破坏<br>Organizational structure is completely broken                  |
|                                                         |          |                                                                            |
| 软骨细胞<br>Chondrocyte                                     | 0        | 正常软骨细胞<br>Normal chondrocytes                                              |
|                                                         | 1        | 弥散性细胞数量增多<br>Number of diffuse cells increased                             |
|                                                         | 2        | 出现增生性细胞簇<br>Chondrocytes show proliferative clusters                       |
|                                                         | 3        | 细胞数量减少<br>Number of chondrocytes decreased                                 |
| 基质染色情况<br>Substrate staining                            | 0        | 正常染色<br>Normal staining                                                    |
|                                                         | 1        | 染色轻度减弱<br>Matrix staining was slightly weakened                            |
|                                                         | 2        | 染色中度减弱<br>Matrix staining was moderately weakened                          |
|                                                         | 3        | 染色重度减弱<br>Matrix staining was severely reduced                             |
|                                                         | 4        | 未染色<br>Substrate unstained                                                 |
| 潮线完整性<br>Tidal-line integrity                           | 0        | 完整<br>Integrity of tide line                                               |
|                                                         | 1        | 出现血管穿越<br>Blood vessel crossing at tide line                               |

域采集 3 张图片,分别为混合光 (Merged)、蓝光 (DAPI)、绿光 (Tunel),计算细胞凋亡率。

1.3.5 免疫组织化学

使用免疫组化法检测各组软骨组织中Ⅱ型胶原蛋白(ColⅡ)与X型胶原蛋白(ColX)的表达水平,每张组织切片在200倍放大倍数下采集3个视野计算平均光密度。

1.3.6 蛋白质免疫印迹 (Western blot)

将各组动物软骨组织置于冰上进行蛋白质提取并进行蛋白质定量检测,按照 Western blot 法依次进行凝胶电泳,转膜、封闭、一抗孵育:TGF-β1 (1 : 1000)、p-ERK (1 : 1000)、p-p38 (1 : 1000)、Bax (1 : 1000)、cleaved-caspase-3 (1 : 1000)、p-Smad2 (1 : 1000)、p-Smad3 (1 : 1000)、β-actin (1 : 1000),最后使用 ECL 法对蛋白条带进行避光显影,于凝胶成像系统中进行曝光拍照,使用 Imagelab 对蛋白质条带进行分析,以 β-actin 作为内参计算各蛋白表达水平。

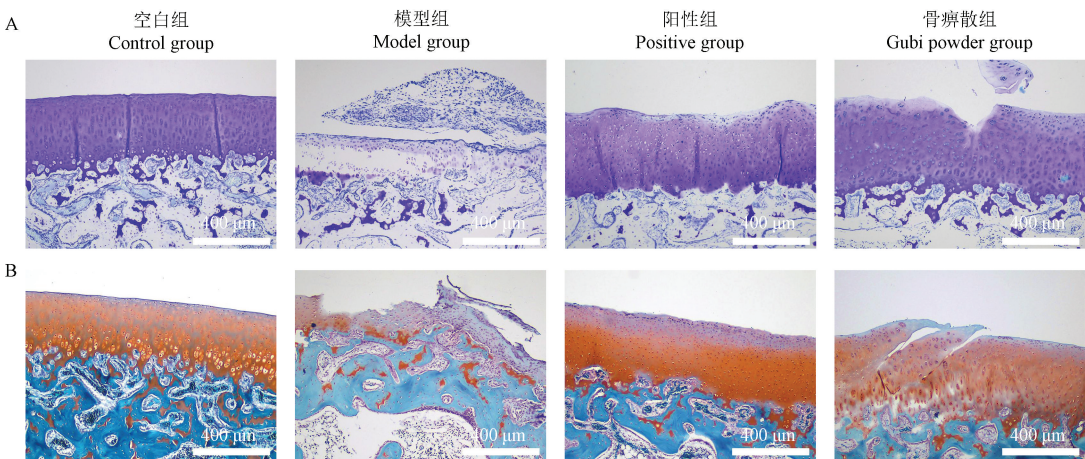
1.4 统计学方法

数据用平均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。使用 SPSS 25.0 进行数据分析,统计方法为单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 骨痹散减轻膝骨关节炎新西兰大白兔组织损伤

甲苯胺蓝染色:与空白组相比,模型组软骨层



注:A;甲苯胺蓝染色;B;番红 O 染色。

图1 各组动物软骨组织染色图

Note. A, Toluidine blue staining. B, Muscovite O staining.

Figure 1 Staining of cartilage tissues in each group

严重破损,分层不明显;与模型组相比,阳性组基本恢复正常,骨痹散组大部分软骨组织已经形成,局部还存在破损。测量软骨层厚度后,与空白组相比,模型组软骨层厚度减少 (*P* < 0.01);与模型组相比,阳性组与骨痹散组软骨层厚度增加 (均 *P* < 0.01),其中阳性组软骨层厚度比骨痹散组更厚 (*P* < 0.01)。

番红 O 染色:空白组关节软骨层厚薄均匀,潮线完整;模型组关节软骨层厚度减少,着色不均,潮线不完整;阳性组关节软骨层厚薄不一,厚度恢复较好,潮线不完整。骨痹散组关节软骨软骨层厚薄不一,局部缺损,厚度比模型组厚,潮线不完整。具体结果见表2,图1。

表2 软骨组织病理变化情况 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 Pathological changes of cartilage tissue

| 组别<br>Groups              | Mankin 评分<br>Mankin score | 软骨层厚度 (μm)<br>Cartilage thickness |
|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| 空白组<br>Control group      | 0.0±0.0                   | 451.7±19.4                        |
| 模型组<br>Model group        | 7.0±0.6**                 | 147.9±29.1**                      |
| 阳性组<br>Positive group     | 3.5±1.0##                 | 407.4±49.1##                      |
| 骨痹散组<br>Gubi powder group | 4.3±1.1##                 | 265.8±51.9##&&                    |

注:与空白组相比,\*\**P* < 0.01;与模型组相比,##*P* < 0.01;与阳性组相比,&&*P* < 0.01。  
Note. Compared with control group, \*\**P* < 0.01. Compared with model group, ##*P* < 0.01. Compared with positive group, &&*P* < 0.01.

### 2.2 骨痹散减少膝骨关节炎新西兰大白兔软骨细胞凋亡

与空白组相比,模型组软骨组织中细胞凋亡率升高,组织内 Bax 与 cleaved-caspase-3 凋亡蛋白表达升高,ERK 与 p38 磷酸化蛋白表达水平升高( $P<0.01$ );与模型组相比,阳性组与骨痹散组软骨组织细胞凋亡率降低,Bax、cleaved-caspase-3、p-ERK 与 p-p38 蛋白表达降低,骨痹散组软骨细胞凋亡率高于阳性组。具体结果见表 3,图 2、图 3。

### 2.3 骨痹散刺激膝骨关节炎新西兰大白兔软骨细胞分化

与空白组相比,模型组膝骨关节炎软骨组织中 Col II、TGF- $\beta$ 1、p-Smad2 与 p-Smad3 表达水平降低,Col X 表达水平升高( $P<0.01$ );与模型组相比,阳性组与骨痹散组软骨组织中 Col II、TGF- $\beta$ 1、p-Smad2 与 p-Smad3 表达水平升高,Col X 表达水平降低( $P<0.05$ ),骨痹散组促进软骨细胞分化的效果弱于阳性组( $P<0.05$ ),具体见表 4,图 4、图 5。

表 3 骨痹散对膝骨关节软骨细胞凋亡的影响( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 3 Effects of Gubi powder on chondrocyte apoptosis in rabbits

| 组别<br>Groups              | 凋亡率(%)<br>Apoptosis rate | Bax            | Cleaved-caspase-3 | p-ERK           | p-p38           |
|---------------------------|--------------------------|----------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| 空白组<br>Control group      | 0.00±0.00                | 1.001±0.014    | 0.999±0.038       | 0.999±0.023     | 1.001±0.010     |
| 模型组<br>Model group        | 41.59±7.27**             | 1.664±0.028**  | 2.679±0.062**     | 2.357±0.037**   | 1.902±0.021**   |
| 阳性组<br>Positive group     | 14.20±8.12##             | 1.250±0.012##  | 1.532±0.080##     | 1.377±0.083##   | 1.447±0.026##   |
| 骨痹散组<br>Gubi powder group | 24.12±11.76##&           | 1.394±0.029##& | 2.057±0.021##&&   | 1.639±0.017##&& | 1.598±0.022##&& |

注:与空白组相比,\*\* $P<0.01$ ;与模型组相比,## $P<0.01$ ;与阳性组相比,& $P<0.05$ ,&& $P<0.01$ 。  
Note. Compared with control group, \*\* $P<0.01$ . Compared with model group, ## $P<0.01$ . Compared with positive group, & $P<0.05$ , && $P<0.01$ .

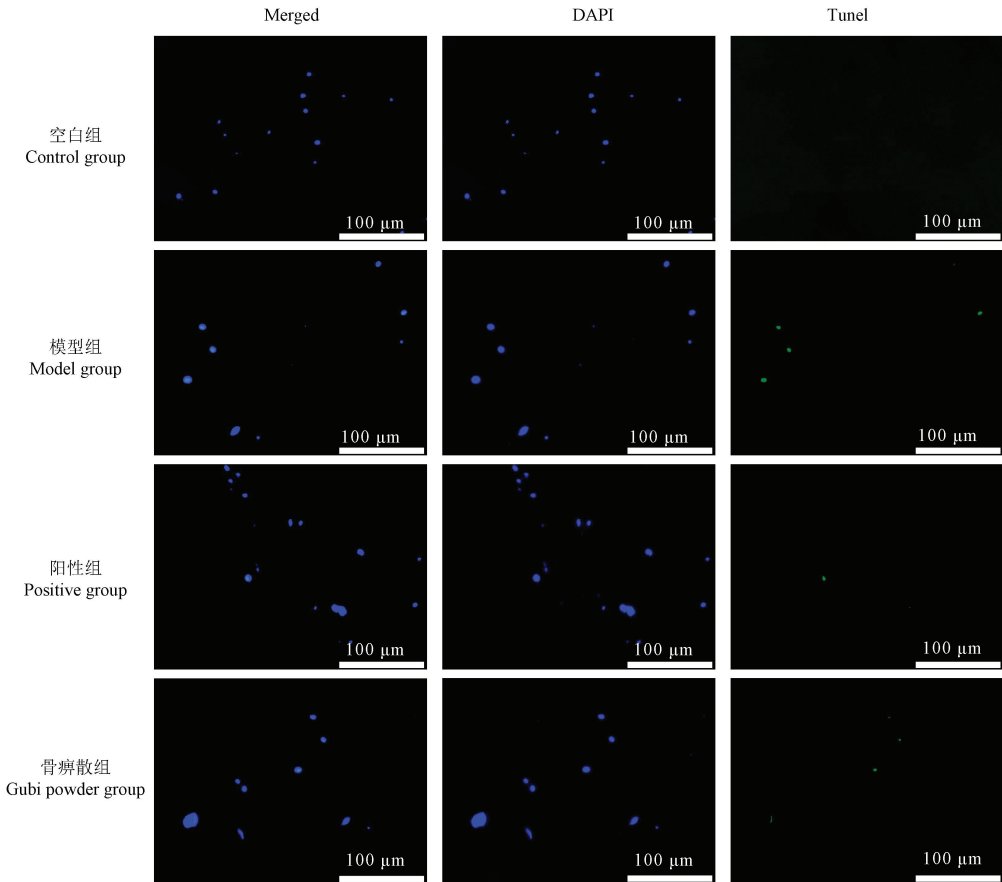


图 2 各组膝骨关节炎兔软骨组织免疫荧光染色图

Figure 2 Immunofluorescence staining of soft tissues of rabbits with knee osteoarthritis in each group

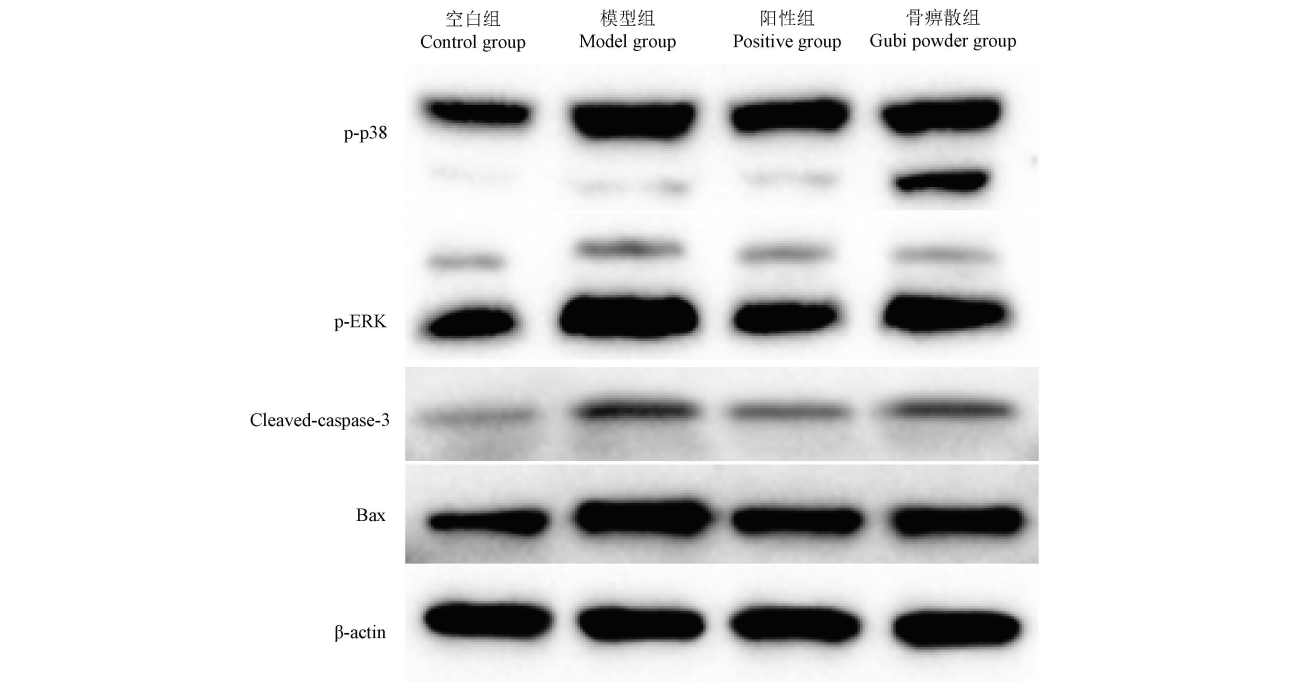


图3 各组膝关节炎软骨组织中蛋白表达水平

Figure 3 Protein expression levels in soft tissue of rabbits with knee osteoarthritis in each group

| 表4 骨痹散对膝骨关节软骨组织中细胞分化的影响(̄x±s)                                                                             |               |                |                |                |                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Table 4 Effect of Gubi powder on cell differentiation in articular cartilage of the knee of white rabbits |               |                |                |                |                |
| 组别<br>Groups                                                                                              | Col II        | Col X          | TGF-β1         | p-Smad2        | p-Smad3        |
| 空白组<br>Control group                                                                                      | 7.360±0.718   | 3.344±0.570    | 1.000±0.007    | 0.999±0.002    | 1.000±0.005    |
| 模型组<br>Model group                                                                                        | 3.212±0.634** | 13.426±2.294** | 0.453±0.014**  | 0.576±0.032**  | 0.548±0.010**  |
| 阳性组<br>Positive group                                                                                     | 6.475±0.954## | 6.227±1.030##  | 0.712±0.014#   | 0.796±0.018#   | 0.822±0.009#   |
| 骨痹散组<br>Gubi powder group                                                                                 | 5.785±0.355## | 9.990±1.598#&  | 0.547±0.012#&& | 0.682±0.022#&& | 0.650±0.008#&& |

注:与空白组相比, \*\*  $P<0.01$ ;与模型组相比, #  $P<0.05$ , ##  $P<0.01$ ;与阳性组相比, &  $P<0.05$ , &&  $P<0.01$ 。  
Note. Compared with control group, \*\*  $P<0.01$ . Compared with model group, #  $P<0.05$ , ##  $P<0.01$ . Compared with positive group, &  $P<0.05$ , &&  $P<0.01$ .

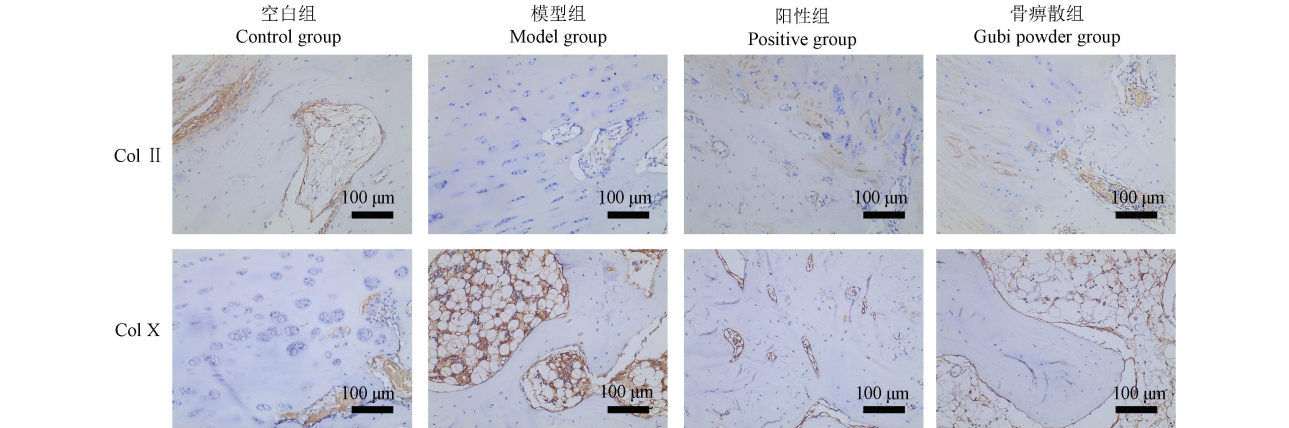


图4 各组动物软骨组织中 Col II 与 Col X 蛋白表达水平

Figure 4 Col II and Col X protein expression levels in cartilage tissues of each group

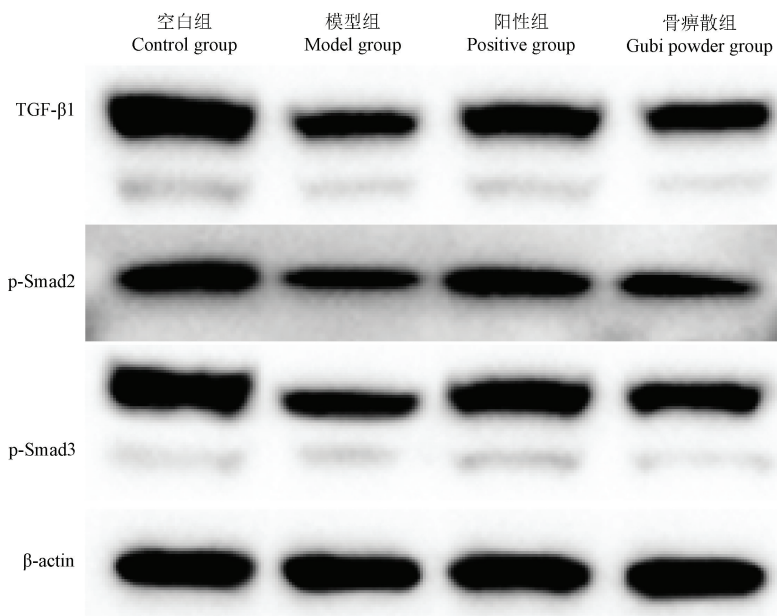


图 5 各组动物软骨组织中 TGF-β1、p-Smad2 与 p-Smad3 蛋白表达水平

Figure 5 Protein expression levels of TGF-β1, p-Smad2 and p-Smad3 in cartilage tissues of each group

### 3 讨论

OA 是一种累及软骨、软骨下骨、韧带、半月板、滑膜的全关节疾病,其中滑膜是一种包裹着关节的薄膜性组织,可分泌透明质酸和润滑剂等物质,维持关节正常功能<sup>[12-13]</sup>。OA 引发的滑膜炎症和纤维化可导致关节软骨细胞凋亡,加速软骨损伤,影响关节功能,最终导致疼痛和关节僵硬<sup>[14]</sup>。本团队发现骨痹散能减少关节软骨组织中凋亡细胞的数量,抑制凋亡蛋白表达,说明骨痹散能帮助细胞对抗由炎症引起的凋亡诱导,同时还发现,软骨组织中 ERK 与 p38 蛋白的磷酸化水平降低,说明骨痹散能抑制 ERK/p38MAPK 通路。MAPK 是导致软骨破坏的关键信号通路,该通路包含 p38MAPK、JNK 和 ERK1/2 等成员,促炎细胞因子如 TNF-α 和 IL-1β 通过激活 p38 细胞内信号通路诱导 OA,ERK1/2 则对聚蛋白多糖酶介导的降解至关重要<sup>[15-16]</sup>。有研究发现,与正常软骨相比,出现关节炎的关节软骨组织中 p38 和 ERK 蛋白表达显著升高<sup>[17]</sup>,这与本实验结果基本一致。因此,抑制关节软骨组织细胞凋亡是治疗 OA 的基础,骨痹散具备治疗 OA 的能力。

OA 通常被定义为关节软骨退行性疾病,关节软骨由被 ECM 包裹的软骨细胞组成,覆盖在关节表面,促进运动并负责减震<sup>[13]</sup>。软骨细胞负责 ECM 的合成、维持和降解,以响应来自细胞因子、炎症介

质和基质碎片的信号<sup>[18]</sup>,其中 ECM 包含的胶原蛋白则是影响软骨组织拉伸强度和形状的关键<sup>[19]</sup>。Col II 能与聚蛋白多糖和其他蛋白多糖一起负责构建 ECM 网络结构<sup>[20]</sup>,Col X 则是肥大软骨细胞的标志蛋白,OA 患者膝骨关节中的软骨细胞会发生肥大分化,导致 Col X 蛋白表达增加,与病症的严重程度呈正相关<sup>[21]</sup>,因为关节软骨缺乏血管和淋巴管,愈合能力有限,会逐渐出现且加重进行性损伤<sup>[22]</sup>。在本实验中,骨痹散增加软骨组织中 Col II 蛋白表达,降低 Col X 蛋白表达,维持与修复软骨组织的结构,减少软骨细胞凋亡与凋亡蛋白表达,确保软骨细胞正常分化。TGF-β1 被证明能通过调节下游 Smad 家族对关节软骨组织与软骨细胞发挥保护作用,并促进 Col II 的合成与分泌<sup>[23]</sup>。在本实验中,骨痹散不仅能直接刺激软骨组织中的 TGF-β1 蛋白表达,还能通过增加 Smad2 与 Smad3 蛋白磷酸化激活 TGF-β/Smad 通路,稳定 ECM 平衡的同时还延缓关节软骨的退变速度,起到保护关节的作用。

综上所述,骨痹散对骨关节炎具有良好的治疗效果,能通过减少软骨细胞凋亡,稳定软骨组织结构,促进软骨组织损伤后再生与修复,其机制可能与抑制 ERK/p38 MAPK 通路、激活 TGF-β/Smad 通路有关。

### 参考文献:

[1] Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis [J]. Lancet,

- 2019, 393(10182): 1745–1759.
- [ 2 ] Kloppenburg M, Berenbaum F. Osteoarthritis year in review 2019: epidemiology and therapy [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2020, 28(3): 242–248.
- [ 3 ] Klein JC, Keith A, Rice SJ, et al. Functional testing of thousands of osteoarthritis-associated variants for regulatory activity [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2434.
- [ 4 ] Goldring SR, Goldring MB. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk [J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(11): 632–644.
- [ 5 ] Mapp PI, Walsh DA. Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2012, 8(7): 390–398.
- [ 6 ] Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function [J]. Sports Health, 2009, 1(6): 461–468.
- [ 7 ] Zhang P, Zhong ZH, Yu HT, et al. Exogenous expression of IL-1Ra and TGF- $\beta$ 1 promotes *in vivo* repair in experimental rabbit osteoarthritis [J]. Scand J Rheumatol, 2015, 44(5): 404–411.
- [ 8 ] 孙剑, 李飞, 薛正海, 等. 温针灸配合微针刀对膝骨性关节炎(风寒湿痹型)临床症状及关节活动度的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(9): 217–220.
- [ 9 ] 郑皓云, 祝永刚, 柳根哲, 等. 铍针松解术配合中医推拿治疗膝骨性关节炎的疗效及安全性分析 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2022, 30(2): 17–21.
- [ 10 ] 金连峰, 顾炜, 马楠. 新止骨增生丸基于 miR-146a 对 TGF- $\beta$ /SMAD 信号转导通路下 TGF- $\beta$ 1、SMAD4 表达的影响及治疗骨性关节炎的作用机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(2): 141–145, 278.
- [ 11 ] 王恒树, 张冲. 自拟组方补肾固筋方对膝骨性关节炎兔血清及关节液白细胞介素-1、肿瘤坏死因子- $\alpha$  的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(5): 1079–1081.
- [ 12 ] Remst DFG, Blaney Davidson EN, van der Kraan PM. Unravelling osteoarthritis-related synovial fibrosis: a step closer to solving joint stiffness [J]. Rheumatology (Oxford), 2015, 54(11): 1954–1963.
- [ 13 ] Yoo KH, Thapa N, Chwae YJ, et al. Transforming growth factor- $\beta$  family and stem cell-derived exosome therapeutic treatment in osteoarthritis [J]. Int J Mol Med, 2022, 49(5): 62.
- [ 14 ] Li M, Luo X, Long X, et al. Potential role of mitochondria in synoviocytes [J]. Clin Rheumatol, 2021, 40(2): 447–457.
- [ 15 ] Wang P, Mao Z, Pan Q, et al. Histone deacetylase-4 and histone deacetylase-8 regulate interleukin-1 $\beta$ -induced cartilage catabolic degradation through MAPK/JNK and ERK pathways [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(4): 2117–2127.
- [ 16 ] Sondergaard BC, Schultz N, Madsen SH, et al. MAPKs are essential upstream signaling pathways in proteolytic cartilage degradation—divergence in pathways leading to aggrecanase and MMP-mediated articular cartilage degradation [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2010, 18(3): 279–288.
- [ 17 ] Hossain MA, Adithan A, Alam MJ, et al. IGF-1 facilitates cartilage reconstruction by regulating PI3K/AKT, MAPK, and NF- $\kappa$ B signaling in rabbit osteoarthritis [J]. J Inflamm Res, 2021, 14: 3555–3568.
- [ 18 ] Ansari MY, Khan NM, Haqqi TM. A standardized extract of *Butea monosperma* (Lam.) flowers suppresses the IL-1 $\beta$ -induced expression of IL-6 and matrix-metalloproteases by activating autophagy in human osteoarthritis chondrocytes [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 96: 198–207.
- [ 19 ] van Spil WE, Kubassova O, Boesen M, et al. Osteoarthritis phenotypes and novel therapeutic targets [J]. Biochem Pharmacol, 2019, 165: 41–48.
- [ 20 ] Kilmer CE, Battistoni CM, Cox A, et al. Collagen type I and II blend hydrogel with autologous mesenchymal stem cells as a scaffold for articular cartilage defect repair [J]. ACS Biomater Sci Eng, 2020, 6(6): 3464–3476.
- [ 21 ] 熊振飞, 汤样华, 王乾, 等. 自拟益气化痰补肾方对膝骨关节炎小鼠  $\beta$ -catenin 信号通路的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(9): 86–90.
- [ 22 ] Hu Y, Gui Z, Zhou Y, et al. Quercetin alleviates rat osteoarthritis by inhibiting inflammation and apoptosis of chondrocytes, modulating synovial macrophages polarization to M2 macrophages [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 145: 146–160.
- [ 23 ] 刘洋, 孙权, 杨砥, 等. 右归丸对骨性关节炎模型大鼠 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(10): 1419–1424.

[ 收稿日期 ] 2022–11–29